

paracetamola i askorbinske kiseline u peroralnom prašku primenom reverzno-fazne tečne hromatografije

Andelija Malenović*, Biljana Jančić-Stojanović, Darko Ivanović

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

* Autor za prepisku: e-mail: andja@pharmacy.bg.ac.rs, Tel.: 011/3951333

Kratak sadržaj

Za istovremenu analizu trokomponentne smeše koja sadrži pseudoefedrin, paracetamol i askorbinsku kiselinu postavljene su dve metode reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (RP-HPLC). Hromatografski sistem Hewlett Packard 1100 koji čini HP 1100 binarna pumpa, HP 1100 UV-VIS detektor i HP ChemStation za automatsku obradu podataka korišćen je za hromatografsko razdvajanje. Postupak je obuhvatio definisanje hromatografskih uslova, validaciju postavljenih metoda, kao i njihovu primenu za ispitivanje sadržaja pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline u peroralnom prašku. Optimalna separacija postignuta je u koloni Platinum Alltech Amino 150 mm x 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, na temperaturi kolone od 30°C. Volumen injektovanja bio je 20 µL. Mobilna faza u *metodi I* bila je smeša metanol-voda (30:70 V/V), pH vrednost podešena na 2,5, a u *metodi II* smeša metanol-voda (60:40 V/V), pH vrednost podešena na 2,9. pH mobilne faze je podešavan sa 85%-tnom orto-fosfornom kiselinom. Talasna dužina detekcije bila je 214 nm u *metodi I* i 257 nm u *metodi II*. Protok mobilne faze za obe metode bio je 1 mL min⁻¹. Postavljene metode su validirane i na osnovu dobijenih parametara procenjeno je da obe predložene metode mogu da se primene za analizu peroralnog praška koji sadrži paracetamol, pseudoefedrin i askorbinsku kiselinu.

Ključne reči: pseudoefedrin, paracetamol, askorbinska kiselina RP-HPLC metoda, validacija

Uvod

Analizirani peroralni prašak predstavlja smešu tri supstance - pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline. Osnovne indikacije za njegovu primenu su različita febrilna stanja, virusne infekcije, itd. Pseudoefedrin ((*1S*, *2S*)-2-metilamino-1-fenilpropan-1-ol hidroklorid) predstavlja diastereoizomer prirodnog alkaloida efedrina od koga je manje bazan, u manjem procentu prolazi u centralni nervni sistem pa se zbog manjeg broja neželjenih efekata primenjuje u kombinaciji sa drugim preparatima u terapiji prehlade, kijavice i sličnih stanja. Paracetamol (N-(4-hidroksifenil)-acetamid) pripada grupi analgoantipiretika i u terapiji se može koristiti sam ili u kombinaciji sa drugim lekovima. Treća komponenta u smeši, askorbinska kiselina ((*R*)-5-[(*S*)-1,2-dihidroksietil]-3,4-dihidroksi-5H-furan-2-on) je hidrosolubilni vitamin koji ima višestruka dejstva: ko-faktor u mnogim značajnim biohemijskim reakcijama, učestvuje u konverziji folne kiseline u folinsku kiselinu, u sintezi kolagena, antitela, itd. Navedene farmaceutske aktivne supstance oficinalne su u mnogim farmakopejama [1, 2] koje za njihovo određivanje u sirovini propisuju različite titrimetrijske metode (npr. za pseudoefedrin-potenciometrijska titracija ili titracija u nevodenoj sredini, za paracetamol-cerimetrijsko određivanje i za askorbinsku kiselinu-jodometrijska titracija). Trokomponentna smeša nije oficinalna ni u jednoj farmakopeji.

U dosadašnjoj literaturi može se naći veliki broj radova u kojima su ispitivani analiti analizirani sami ili u smeši sa drugim lekovima različitim hromatografskim metodama. Tako je pseudoefedrin u smeši sa različitim supstancama ispitivan primenom RP-HPLC metode [3-8] pri čemu je u radovima [4, 5, 8] jedna od supstanci bila paracetamol. Takođe, publikovani su i radovi gde su primenjene druge hromatografske metode kao što je tečna hromatografija hidrofilnih interakcija [9-11] ili micelarna tečna hromatografija [12, 13]. Takođe, pseudoefedrin u kombinaciji sa ibuprofenom i loratadinom određivan je primenom derivativne spektrofotometrije [14]. Iz farmaceutskih oblika, u smeši sa različitim lekovima, paracetamol je određivan RP-HPLC metodom [4, 5, 8, 15-20]. Različite spektroskopske metode primenjivane su za analizu analgetskih smeša sa paracetamolom [19, 21-23]. Opisane su različite hromatografske metode za analizu askorbinske kiseline u farmaceutskim preparatima u kombinaciji sa drugim vitaminima, kao i sa različitim aktivnim supstancama i neki od tih radova dati su u referencama [24-30]. I pored velikog broja publikovanih radova u kojima su analizirane supstance određivane same ili u smešama sa drugim supstancama hromatografskim metodama, nema radova u kojima je opisano istovremeno određivanje pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline primenom hromatografije.

Cilj ovog rada bio je da se definiše hromatografski postupak za istovremeno određivanje pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline, zatim da se izvrši procena nekih analitičkih parametara za validaciju RP-HPLC tehnike (selektivnost, linearnost, preciznost) i da se odredi sadržaj ispitivanih supstanci u komercijalnom

peroralnom prašku. S obzirom da je pregledom literature potvrđeno da RP–HPLC metoda za njihovo istovremeno određivanje nije postavljena, predložene metode su nove i omogućavaju brzo ispitivanje preparata navedenog sadržaja. Da bi se dobili što optimalniji rezultati postavljena je RP–HPLC metoda uz ispitivanje mogućnosti primene dve mobilne faze.

Aparatura i reagensi

Hemikalije. Svi korišćeni reagensi bili su HPLC čistoće. Za pripremu mobilne faze korišćeni su metanol – *gradient grade* (Lab Scan, Ireland), HPLC *grade* voda i 85%–tna ortofosfatna kiselina (Carlo Erba, Milano, Italy).

Standardi i uzorci. Za ispitivanje korišćeni su radni standardi pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline. Radni standardi su standardizovani u odnosu na odgovarajuće referentne standarde. Analiziran je komercijalno dostupan peroralni prašak. Jedna kesica praška sadrži 30 mg pseudoefedrina, 350 mg paracetamola i 100 mg askorbinske kiseline.

Hromatografski uslovi. Hromatografski sistem Hewlett Packard 1100 koji čini HP 1100 binarna pumpa, HP 1100 UV-VIS detektor i HP ChemStation za automatsku obradu podataka korišćen je za hromatografsko ispitivanje. Kolone koje su korišćene u preliminarnim ispitivanjima: Platinium Alltech Amino 150 mm x 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, Cyano 150 mm x 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, Alltech C8 250 mm x 4,6 mm, 5 µm veličine čestica i Beckman 150 mm x 4,6 mm, 5 µm veličine čestica. Optimalna separacija je postignuta na koloni Alltech C8 250 mm x 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, na temperaturi od 30°C. Volumen injektovanja bio je 20 µL. Mobilna faza u *metodi I* bila je smeša metanol–voda (30:70 V/V), pH 2,5, a u *metodi II* smeša metanol–voda (60:40 V/V), pH 2,9. pH mobilne faze podešavan je 85%–tnom ortofosfatnom kiselinom. Talasna dužina detekcije bila je 214 nm u *metodi I* i 257 nm u *metodi II*. Protok mobilne faze kod obe metode bio je 1 mL min⁻¹.

Za statističku obradu podataka korišćen je program Exel.

Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti – *metoda I*

Rastvori standarda pripremljeni su u mobilnoj fazi u sledećim koncentracijama: 10; 20; 30; 50; 70 i 100 µg mL⁻¹ za pseudoefedrin; 5; 10; 20; 30; 35; 40 i 50 µg mL⁻¹ za paracetamol i 10; 30; 50; 70; 100; 120 i 150 µg mL⁻¹ za askorbinsku kiselinu. Svaki rastvor injektovan je po tri puta u hromatografski sistem i određene su površine pikova.

Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti – *metoda II*

Rastvori standarda pripremljeni su u mobilnoj fazi u sledećim koncentracijama: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 i 1,0 mg mL⁻¹ za pseudoefedrin, 8,75; 17,5; 35; 87,5; 175;

262,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za paracetamol i 2; 4; 10; 20; 30 i 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za askorbinsku kiselinu. Svaki rastvor injektovan je po tri puta u hromatografski sistem i određene su površine pikova.

Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti – metoda I

Rastvori standarda za procenu preciznosti metode pripremljeni su u mobilnoj fazi u sledećim koncentracijama 20; 30 i 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za pseudoefedrin, 30; 35 i 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za paracetamol i 70; 100 i 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za askorbinsku kiselinu. Pripremljeno je po 10 rastvora svake koncentracije, injektovan u hromatografski sistem i određene su površine pikova.

Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti – metoda II

Rastvori standarda za procenu preciznosti metode pripremljeni su u mobilnoj fazi u sledećim koncentracijama 0,4; 0,6 i 0,8 mg mL^{-1} za pseudoefedrin, 17,5; 35 i 87,5 $\mu\text{g/mL}$ za paracetamol i 4; 10 i 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za askorbinsku kiselinu. Pripremljeno je po 10 rastvora svake koncentracije, injektovan u hromatografski sistem i određene su površine pikova.

Priprema rastvora uzorka – metoda I

Za određivanje sadržaja pseudoefedrina i askorbinske kiseline. Odmerena je masa praška koja sadrži 30 mg pseudoefedrina i 100 mg askorbinske kiseline, prenetu u odmerni sud od 100 ml, dodato je oko 70 ml mobilne faze i rastvoreno. Mobilnom fazom odmerni sud dopunjen je do oznake. Koncentracija pseudoefedrina je 0,3 mg mL^{-1} i askorbinske kiseline 1 mg mL^{-1} . Od ovog rastvora pripremljeno je razblaženje koje sadrži 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pseudoefedrina i 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ askorbinske kiseline. Pripremljeno je deset rastvora i injektovani su pod navedenim hromatografskim uslovima.

Za određivanje sadržaja paracetamola. Odmerena je masa praška koja sadrži 350 mg paracetamola, prenetu u odmerni sud od 100 mL, dodato je oko 70 mL mobilne faze i rastvoreno. Mobilnom fazom sud je dopunjen do oznake. Koncentracija paracetamola je 3,5 mg mL^{-1} . Od ovog rastvora pripremljeno je razblaženje koje sadrži 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ paracetamola. Pripremljeno je deset rastvora i injektovano pod navedenim hromatografskim uslovima.

Priprema rastvora uzorka – metoda II

Za određivanje sadržaja paracetamola i askorbinske kiseline. Odmerena je masa praška koja sadrži 35 mg paracetamola i 10 mg askorbinske kiseline, prenetu u odmerni sud od 100 ml, dodato je oko 70 mL^{-1} mobilne faze i rastvoreno. Mobilnom fazom sud je dopunjen do oznake. Koncentracija paracetamola je 0,35 mg mL^{-1} i askorbinske

kiseline 0,1 mg mL⁻¹. Od ovog rastvora pripremljeno je razblaženje koje sadrži paracetamola 35 µg mL⁻¹ i askorbinske kiseline 10 µg mL⁻¹. Pripremljeno je deset rastvora i injektovano pod navedenim hromatografskim uslovima.

Za određivanje sadržaja pseudoefedrina. Odmerena je masa praška koja sadrži 60 mg pseudoefedrina, preneti u odmerni sud od 50 mL, dodato je oko 35 mL mobilne faze i rastvoreno. Mobilnom fazom sud je dopunjen do oznake. Koncentracija pseudoefedrina je 1,2 mg mL⁻¹. Od ovog rastvora pripremljeno je razblaženje koje sadrži 0,6 mg mL⁻¹ pseudoefedrina. Pripremljeno je deset rastvora i injektovano pod navedenim hromatografskim uslovima.

Koncentracije supstanci u ispitivanim uzorcima određene su iz dobijenih kalibracionih krivih.

Rezultati

Pod definisanim hromatografskim uslovima određeni su parametri koji karakterišu hromatografski sistem i rezultati su prikazani u Tabeli I.

Tabela I Hromatografski parametri

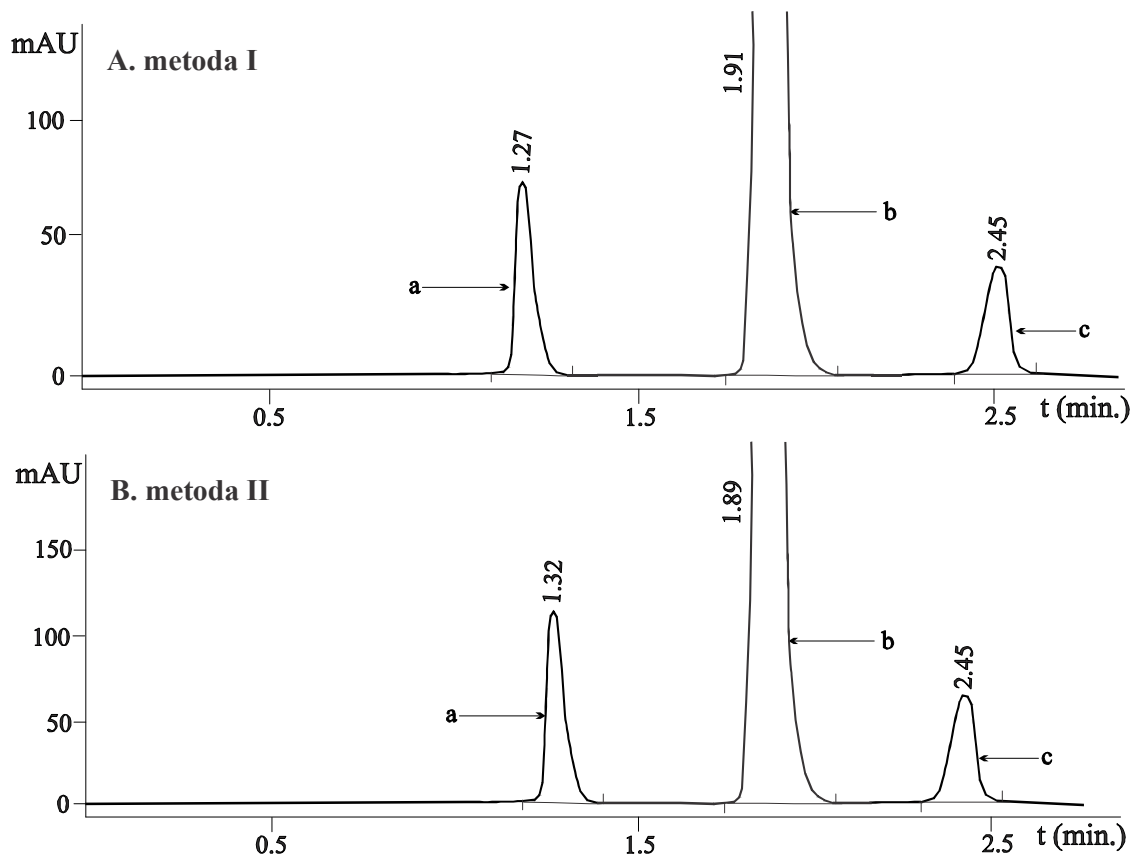
Table I Chromatographic parameters

	retenciono vreme t_r retention time	retencioni faktor k (retention factor)	faktor selektivnosti α selectivity factor
Metoda I			
pseudoefedrin	1,27	2,54	1,50*
paracetamol	1,91	3,82	
askorbinska kiseline	2,45	4,68	1,22**
Metoda II			
pseudoefedrin	1,319	1,64	1,71*
paracetamol	1,899	2,80	
askorbinska kiseline	2,45	3,91	1,4**

* α_1

** α_2

Reprezentativni hromatogrami prikazani su na Slici 1 (A. metoda I i B. metoda II).



Slika 1. Hromatogram analize: a) pseudoefedrin, b) paracetamol i c) askorbinska kiselina;

A. metoda I: mobilna faza metanol–voda (30:70 v/v), pH 2,5, $\lambda = 214$ nm, 30°C, protok mobilne faze 1 mL min.⁻¹

B. metoda II: mobilna faza metanol–voda (60:40 v/v), pH 2,9, $\lambda = 257$ nm, 30°C, protok mobilne faze 1 mL min.⁻¹.

Figure 1. Chromatogram: a) pseudoephedrine b) paracetamol and c) ascorbic acid;

A. Method I: mobile phase methanol–water (30:70 V/V), pH 2.5; $\lambda = 214$ nm, 30°C, mobile phase flow rate 1 mL min.⁻¹

B. Method II: mobile phase methanol–water (60:40 V/V), pH 2.9; $\lambda = 257$ nm, 30°C, mobile phase flow rate 1 mL min.⁻¹

Rezultati za procenu linearnosti metoda u definisanom opsegu koncentracija prikazani su u Tabeli II.

Tabela II Značajni parametri kalibracione krive

Table II The important parameters for calibration curve

Komponenta Compound	Opseg koncentracija Concentration range	$y = ax + b$	r	S_b
Metoda I				
pseudoefedrin	10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$22,62x + 82,17$	0,9993	32,89
paracetamol	5–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$34,89x + 14,90$	0,9997	15,70
askorbinska kiselina	10–150 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$14,00x + 9,43$	0,9999	13,15
Metoda II				
pseudoefedrin	0,1–1 mg mL^{-1}	$845,58x + 0,1$	0,9996	8,2
paracetamol	8,75–262,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$55,22x + 390,2$	0,9991	265,3
askorbinska kiselina	2–40 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$38,92x + 1,3$	0,9998	13,7

r – koeficijent korelacije;

S_b – standardna devijacija odsečka

U Tabeli III dati su parametri koji definišu preciznost postavljenih metoda.

Tabela III Procena preciznosti

Table III Estimation of method precision

Komponenta Compound	Injektovano Injected	Nađeno Found	CV (%)	R (%)
Metoda I				
pseudoefedrin ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	20	$19,51 \pm 0,39^*$	2,0	97,6
	30	$30,12 \pm 0,55$	1,8	100,4
	50	$50,17 \pm 1,62$	3,2	100,4
paracetamol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	30	$30,10 \pm 1,4^*$	4,6	100,3
	35	$36,57 \pm 0,87$	2,4	104,5
	40	$42,43 \pm 0,63$	1,5	106,1
askorbinska kiselina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	70	$73,15 \pm 2,01^*$	2,7	104,5
	100	$105,74 \pm 1,47$	1,4	105,7
	120	$128,4 \pm 1,53$	1,2	106,9
Metoda II				
pseudoefedrin (mg mL^{-1})	0,4	$0,394 \pm 0,007^*$	1,8	98,5
	0,6	$0,601 \pm 0,007$	1,2	100,2
	0,8	$0,798 \pm 0,01$	1,5	99,7
paracetamol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	17,5	$16,46 \pm 0,50^*$	3,0	94,0
	35	$36,22 \pm 0,63$	1,7	103,5
	87,5	$89,68 \pm 1,10$	1,3	102,5
askorbinska kiselina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4	$3,96 \pm 0,14^*$	3,5	99,1
	10	$9,74 \pm 0,20$	1,9	97,4
	20	$19,60 \pm 0,20$	1,2	99,0

*Sd (n=10)

Sadržaj pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline u peroralnom prašku izražen kroz *Recovery* (R) vrednost prikazan je u Tabeli IV.

Tabela IV Sadržaj pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline u peroralnom prašku

Table IV Content of pseudoefedrine, paracetamole and ascorbic acid in multicomponent powder

Komponenta Compound	Uzeto Taken	Nađeno Found	Nađeno mg/kes. Found mg/sachet	CV (%)	R (%)
Metoda I					
pseudoefedrin	30 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$31,56 \pm 0,25^*$	31,56	0,8	105,2
paracetamol	35 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$34,76 \pm 0,20$	347,56	0,6	99,3
askorbinska kiselina	100 mL^{-1} μg	$10,79 \pm 0,15$	107,86	1,4	107,9
Metoda II					
pseudoefedrin	0,6 mL^{-1} mg	$0,642 \pm 0,018$	32,02	2,5	106,7
paracetamol	35 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$35,98 \pm 0,38$	359,8	1,0	102,8
askorbinska kiselina	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$10,84 \pm 0,07$	108,44	0,6	108,4

*S (n=10)

* mg mL^{-1}

Diskusija

Ispitivana višekomponentna smeša sadrži tri supstance različite polarnosti, liposolubilnosti i hemijske strukture. Pored toga, u preparatu se nalaze u različitim koncentracijama što dodatno otežava njihovu hromatografsku analizu. Da bi se definisali optimalni hromatografski uslovi za njihovu separaciju ispitano je njihovo ponašanje na različitim stacionarnim fazama (oktadecil – C_{18} , oktil – C_8 , –amino, –cijano). Na kolonama sa nepolarnom stacionarnom fazom (C_{18} , C_8), sa metanolom kao organskim modifikatorom u mobilnoj fazi, postignuto je odgovarajuće razdvajanje između paracetamola i askorbinske kiseline ($\alpha > 1,2$). Redosled eluiranja bio je askorbinska kiselina, paracetamol pa pseudoefedrin. Injektovanjem smeše koja

odgovara odnosu koncentracija u preparatu došlo je do koeluiranja pikova pseudoefedrina i paracetamola. Paracetamol je prisutan u znatno većoj koncentraciji u preparatu. Modifikacije u smislu promene organskog dela mobilne faze, dodatka različitih modifikatora (sirćetna kiselina, trietilamin itd), kao i promene pH vrednosti mobilne faze, nisu dale zadovoljavajuće rezultate.

Znatno bolji rezultati dobijeni su na amino koloni (150 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica). Pikovi ispitivanih supstanci su simetrični (As između 1,0 i 1,2), separacija optimalna (faktor separacije je veći od 1,2 za posmatrane parove smeše) i kratko vreme trajanja analize. S obzirom na polarnost amino kolone ispitan je uticaj udela metanola u mobilnoj fazi (30 i 60% V/V). Utvrđeno je da pri pH vrednosti manjoj od 3,0 sadržaj metanola u mobilnoj fazi nema značajnog uticaja na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci. Red eluiranja bio je pseudoefedrin, paracetamol pa askorbinska kiselina. Promena redosleda eluiranja u odnosu na nepolarnu C₁₈ kolonu uslovljen je većom polarnošću amino kolone koja se u zavisnosti od primenjene mobilne faze može koristiti i u reverzno-faznoj i normalno-faznoj hromatografiji.

Na amino koloni moguće je postići zadovoljavajuću separaciju ispitivanih supstanci primenom mobilnih faza koje sadrže 30% metanola, pH 2,5 (*metoda I*) i 60 % metanola, pH 2,9 (*metoda II*). Kod *metode I* detekcija je vršena na 214 nm, a kod *metoda II* na 257 nm. Validacija ispitivanih metoda izvršena je u različitim opsezima koncentracija pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline.

Hromatografski parametri dobijeni pod datim uslovima prikazani su u Tabeli I. Primenom navedenih mobilnih faza postignuto je zadovoljavajuće vreme zadržavanja ispitivanih supstanci na koloni ($k > 1$), kao i adekvatna separacija ($\alpha >> 1$) [31].

Ispitana je linearnost *metode I* i *metode II* u definisanim opsezima koncentracija i dobijeni rezultati prikazani u Tabeli II. Prema zahtevima FDA i ICH linearnost metode procenjuje se preko parametara koji karakterišu kalibracionu krivu. Dobijene vrednosti parametara odgovaraju zahtevima, pa se može reći da je linearnost zadovoljena u veoma širokim koncentracionim intervalima što je i bio jedan od ciljeva ispitivanja postavljenih hromatografskih metoda. Dobra preciznost obe metode potvrđena je vrednostima za standardnu devijaciju (Sd) i koeficijent varijacije (Kv) koji su prikazani u Tabeli III. Sadržaj paracetamola, pseudoefedrina i askorbinske kiseline u peroralnom prašku određen je primenom *metoda I* i *II*. Na osnovu dobijenih *Recovery* (R) vrednosti prikazanih u Tabeli IV može se zaključiti da se obe metode mogu primenjivati u cilju ispitivanja ovog preparata.

Zaključak

Predložene RP–HPLC metode predstavljaju pouzdane, jednostavne i selektivne metode za analizu pseudoefedrina, paracetamola i askorbinske kiseline. Postavljeni i

validirani postupci zadovoljavaju postavljene kriterijume pa se mogu koristiti u rutinskoj analizi preparata koji sadrže analizirane supstance. Oba postupka omogućavaju da se za kratko vreme odrede tri komponente što je od izuzetnog značaja za rutinsku analizu.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije za podršku u okviru istraživanja na Projektu 172052.

Literatura

1. European Pharmacopoeia 7th Edition, Council of Europe, Strasbourg 2011.
2. USP35/NF30 (2012) Rockville, Maryland, USA.
3. Induri, M., Fathima, A., Bhagavan, R. M., Rajendra, P. Y. Simultaneous quantification of pseudoephedrine hydrochloride and fexofenadine hydrochloride in tablets by liquid chromatography. *Jordan J Pharm Sci.* 2013; 6.
4. Gonjare, N. S., Palled, M. S., Mane, A. K., Khire, V. G., Deshmukh, V. N., Bhat, A. R. Method development and validation for the simultaneous determination of paracetamol, pseudoephedrine hydrochloride, and levocetirizine hydrochloride in tablet dosage form. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2014, 5: 247–260.
5. Xuan, X., Huang, L., Pan, X., Li, N. Simultaneous determination of five cold medicine ingredients in paracetamol triprolidine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride tablets by pH/organic solvent double-gradient high performance liquid chromatography. *Chin J Chrom* 2013, 31: 133–138.
6. Caglar, S., Toker, S. E. Simultaneous determination of desloratadine and pseudoephedrine sulfate in tablets by high performance liquid chromatography and derivative spectrophotometry. *Rev Anal Chem* 2011, 3-4:145–151.
7. Manassra, A., Khamis, M., el-Dakikiy, M., Abdel-Qader, Z, Al-Rimawi, F. Simultaneous HPLC analysis of pseudoephedrine hydrochloride, codeine phosphate, and triprolidine hydrochloride in liquid dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 2010, 51:991–993.
8. Vignaduzzo, S. E., Kaufman, T. S. Development and validation of a HPLC method for the simultaneous determination of bromhexine, chlorpheniramine, paracetamol, and pseudoephedrine in their combined cold medicine formulations. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 2013, 36: 2829–2843.

9. Ali, M.S.; Ghori, M.; Rafiuddin, S.; Khatri, A.R. A new hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) procedure for the simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride (PSH), diphenhydramine hydrochloride (DPH) and dextromethorphan hydrobromide (DXH) in cough-cold formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 43 (1), 158–167.
10. Heaton, J.; Gray, N.; Cowan, D.A.; Plumb, R.S.; Legido-Quigley, C.; Smith, N.W. Comparison of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of ephedrine. *J Chromatogr A* 2012, 1228, 329–337.
11. Jovanović, M., Rakić, T., Ivanović, D., Jančić-Stojanović, B.: Optimization of the separation of ephedrine, pseudoephedrine, phenylephrine, and synephrine by hydrophilic interaction liquid chromatography employing experimental design methodology. *Inst Sci Technol* 2015, 43: 156–169.
12. Wahba, M. E. K., Simultaneous determination of ascorbic acid, pseudoephedrine hydrochloride and ibuprofen in their combined tablets using micellar liquid chromatography. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 2015, 38: 65–61.
13. Dong, Y-M., Li, N., An, Q., Lu, N.-W. A novel nonionic micellar liquid chromatographic method for simultaneous determination of pseudoephedrine, paracetamol, and chlorpheniramine in cold compound preparations. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 2015, 38: 251–258.
14. Ivanović D., Medenica M., Marković S., Mandić G., The Second-derivative Spectrophotometric Assay of Pseudoephedrine, Ibuprofen and Loratadine in Pharmaceuticals. *Arzneimittel-Forschung, Drug Research* 2000; 50: 1004–1008.
15. Dewani, A. P., Shelke, P. G., Bakal, R. L., Jaybhaye, S. S., Chandewar, A. V., Patra, S. Gradient HPLC-DAD determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, cetirizine in tablet formulation. *Drug Res.* 2014; 64: 251–256.
16. Irshad Alam, M. D., Khanam, N. Ganguly, S., Barik, S., Siddiqui, A. R. Development of assay method and forced degradation study of dexibuprofen and paracetamol by RP-HPLC in tablet formulation. *Der Pharm Lett.* 2014; 6: 184–191.
17. Khan, I. U., Ashfaq, M., Razzarq, S. N., Mariam, I. Simultaneous determination of piroxicam and paracetamol in pharmaceutical formulations using stability indicating HPLC method. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 2013, 36: 1437–1450.
18. Dongre, V. G., Shah, S. B., Bayes, G. S., Phadke, M., Jadhav, V. K. Simultaneous determination of etodolac and acetaminophen in tablet dosage form by RP-LC. *Chromatographia* 2009, 69:1019–1023.
19. Parissipoulou M, Panderi I. Determination of Hyoscine N-Btyl-Bromide, Lidocaine hydrochloride, and paracetamol in injection forms using solid-phase extraction, high-performance liquid-chromatography, and UV-VIS spectrophotometry. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 1999; 1055–1068.
20. Ivanović D., Medenica M., Malenović A., Jančić B., Mišljenović Đ., Optimization of the RP-HPLC method for multicomponent analgetic drug determination. *Boll Chim Farmaco.* 2003; 9 : 386–389.

21. Medenica M., Ivanović D., Malenović A., The second-derivative spectrophotometric assay of a multicomponent analgetic mixture. *Spect Lett.* 2000; 33 : 173–173.
22. Tantishaiyakul V, Phadoongsombut N, Kamaung S, Womgwisansri S, Mathurod. Fourier-transform infrared spectrometric determination of paracetamol and ibuprofen in ablets. *Die Pharmazie* 1999; 54: 111–114.
23. Nogowska M, Muszalska I, Zajac M. Simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic-acid, paracetamol and caffeine in pharmaceutical preparation. *Chem Anal.* 1999; 44 : 1041–1048.
24. Langrer, S., Lodge, J. K. Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: A comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in a breakfast cereal matrix. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2014; 960: 73-81.
25. Shi, H., Qui, L.-Y., Jin, Y., Jin, L.-Y. Determination of the contents of water-soluble vitamin for injection by HPLC. *Chin Pharm J.* 2007, 42; 1501–1504.
26. Vidivic, S., Stojanović, B., Veljković, B., Pražić-Arsić, L., Roglić, G., Manojlović, D. Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method. *J Chromatogr A.* 2008, 155–162.
27. Ivanović D, Popović A, Radulović D, Medenica M. Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal.* 1999; 18: 999–1004.
28. Dudhwal, R., Jagadish, P. C., Bhat, K., Mane, A. Simultaneous estimation of ascorbic acid and calcium pantothenate in: Multivitamin and multimineral tablets by reverse-phase HPLC. *Der Pharm Chem.* 2011, 3: 357–381.
29. Ahmida, M. H. S. Determination of ascorbic acid in vitamin C (Tablets) by high-performance liquid chromatography. *Asian J Chem* 2009; 21: 6463–6467.
30. Vazquez, R., Rotival, R., Calvez, S. Le Hoang, M. -D., Graffard, H., Guyon F., Do, B. Stability indicating assay method on vitamins: Application to their stability study in parenteral nutrition admixtures. *Chromatographia* 2009, 69: 629–635.
31. Ivanović, D., Zečević, M., Malenović, A.: *Analitika lekova – udžbenik za laboratorijsku nastavu.* Beograd, 2004.

Determination of pseudoephedrine, paracetamole and ascorbic acid in multicomponent powder using reversed-phase chromatographic method

Andelija Malenović*, Biljana Jančić-Stojanović, Darko Ivanović

University of Belgrade – Faculty of pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Summary

For the simultaneous analysis of multicomponent mixture containing pseudoephedrine, paracetamole and ascorbic acid two RP-HPLC methods were developed. Separation were performed on Hewlett Packard 1100 system which consisted of HP 1100 binary pump, HP 1100 UV/VIS detector and HP ChemStation for the automatic data evaluation. Methods were developed, e. g. chromatographic conditiond settled, methods submitted to method validation and then applied for the determination of content of multicomponent powder. The best separation was achived on Platinum Alltech Amino 150 x 4.6 mm, 5 μ m particle size column, at 30°C. Injection volume was 20 μ L. Mobile phase in *mehtod I* was a mixture of methanol–water (30:70 V/V), pH 2.5, and in *mehtod II* was a mixture methanol–water (60:40 V/V), pH 2.9. pH of the mobile phases were adjusted with 85% ortophosphoric acid. Detection was performed at 214 nm in *mehtod I* and at 257 nm in *method II*. Flow rate was 1 mLmin⁻¹. Developed methods were validated. Obtained results showed that both methods are suitable for routine analysis of pharmaceutical dosage forms which contain pseudoephedrine, paracetamole and ascorbic acid.

Key words: pseudoephedrine, paracetamole, ascorbic acid, RP-HPLC , validation
